

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Anita Rakitić

Komunikacija u rizosferi: Uloga flavonoida

Završni rad

Mentor: Dr. sc. Vesna Peršić, doc.

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

KOMUNIKACIJA U RIZOSFERI: ULOGA FLAVONOIDA

Anita Rakitić

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Odjel za biologiju

Mentor: Dr.sc. Vesna Peršić, doc.

Kratak sažetak završnog rada:

Flavonoidi su raznolika skupina biljnih spojeva koji imaju ulogu u zaštiti od UV zračenja, djeluju kao antioksidansi, pigmenti, regulatori transporta auksina, obrambeni spojevi protiv patogena i kao signalne molekule u simbiozi. U ovom radu naglašene su neke od poznatih funkcija flavonoida u rizosferi, posebno u interakciji korijena s mikroorganizmima. Ovisno o njihovoj strukturi, pokazalo se da flavonoidi stimuliraju ili inhibiraju ekspresiju nod gena u korijenu, inhibiraju patogene organizme koji napadaju korijen, stimuliraju klijanje spora gljivica i granjanje hifa, posreduju u alelopatskim interakcijama između biljaka.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: flavonoidi, antioksidansi, kvercetin, alelopatija

Rad je pohranjen na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u sveučilišnom i nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD**Bachelor thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural science**Scientific Field:** Biology**COMMUNICATION IN THE RHIZOSPHERE: THE ROLE OF FLAVONOIDS****Anita Rakitić****Thesis performed at** the Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry, Department of Biology**Supervisor:** Dr.sc. Vesna Peršić, Assist. Prof.**Short abstract**

The flavonoid pathway produces a diverse array of plant compounds with functions in UV protection, as antioxidants, pigments, auxin transport regulators, defence compounds against pathogens and during signalling in symbiosis. This paper highlights some of the known function of flavonoids in the rhizosphere, in particular for the interaction of roots with microorganisms. Depending on their structure, flavonoids have been shown to stimulate or inhibit the rhizobial nod gene expression, cause chemoattraction of rhizobia towards the root, inhibit root pathogens, stimulate mycorrhizal spore germination and hyphal branching, mediate allelopathic interactions between plants.

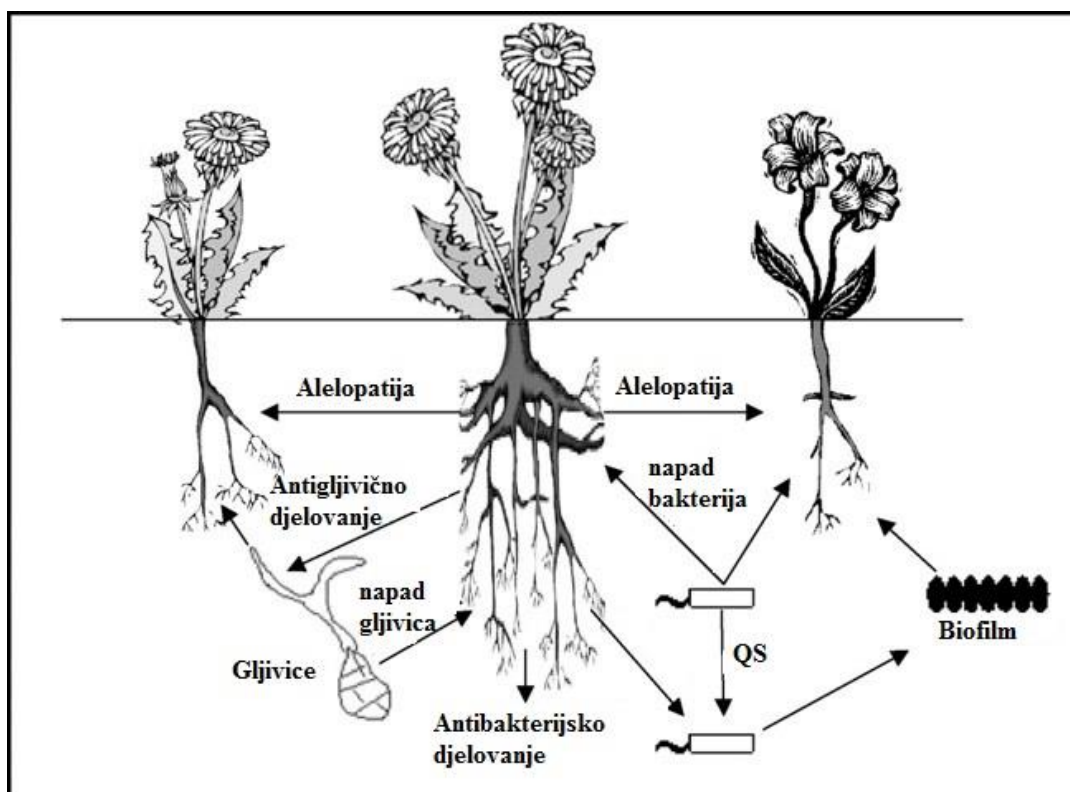
Original in: Croatian**Key words:** flavonoids, antioxidants, quercetin, allelopathy**Thesis deposited:** on the web site of the Department of Biology and in Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEMATSKI DIO.....	3
2.1. Podjela i svojstva flavonoida.....	3
2.2. Biološke aktivnosti flavonoida.....	5
2.3. Flavonoidi u rizosferi.....	6
2.3.1. Interakcija sa elicitorima.....	8
2.3.2. Utjecaj na mikorizu.....	9
2.3.2.1. Utjecaj na nodulaciju (simbioza sa bakterijama roda <i>Rhizobium</i>)..	9
2.3.2.2. Utjecaj na nodulaciju (simbioza sa bakterijama roda <i>Frankia</i>).....	11
2.3.3. Zaštita od patogenih organizama.....	12
2.3.4. Alelopatija.....	14
3. ZAKLJUČAK.....	16
4. LITERATURA.....	17

1. UVOD

Korijen je podzemni organ biljke koji štiti biljku i omogućuje joj usvajanje hranjivih tvari i vode. Rast i razvoj korijena prati odgovarajuću opskrbu hranjivim tvarima i određen je uglavnom biljnom vrstom, vodnim potencijalom tla i njegovom interakcijom s tlom. Biološki najaktivniji sloj tla koji se nalazi uz korijen biljke naziva se rizosfera. U rizosferi se odvijaju složeni fizikalni, kemijski i biološki procesi koji kroz interakciju korijena, tla i zemljišnih organizama modificiraju tlo i utječu na populacije mikroorganizama, a samim time i na rast i razvoj korijena te efikasnost usvajanja hranjivih tvari i vode. Interakcije se odvijaju između tla i korijenja biljaka, između korijenja biljaka i mikroorganizama, između samih biljaka i samih mikroorganizama, kroz brojne složene procese. Važnost tih interakcija očituje se kroz efikasno iskorištavanje hranjivih tvari i vode, prilagodbe i preživljavanje biljaka u stresnim uvjetima kao i mogućnosti korištenja biljaka u sanaciji onečišćenih tala (Walker i sur. 2003).



Slika 1. Složene interakcije posredovane korijenskim eksudatima koji se odvijaju u rizosferi između korijena biljaka i drugih organizama. QS, quorum sensing (Preuzeto i modificirano prema Walker i sur. 2003)

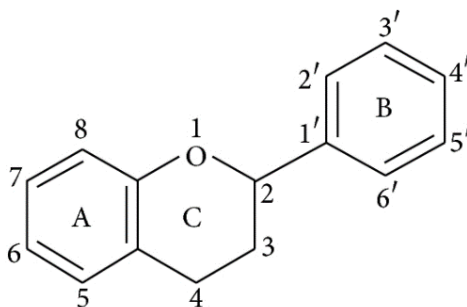
Oslobađanjem eksudata korijen utječe na mikroorganizme, njihovu brojnost i aktivnost. U rizosferi su prisutne mnoge organske tvari koje luče same biljke, ali i najveća količina mineralnih hranjivih tvari koje usvajaju više biljke, jer je to područje najveće razmijene tvari i energije između biljnog korijena i okolnog tla. Prema načinu na koji se izlučuju kroz staničnu membranu, postoje tri skupine eksudata korijena. Prvu skupinu čine spojevi, kao što su amino kiseline, organske kiseline, šećeri i fenolni spojevi. Oni se iz stanica korijena, gdje je njihova koncentracija veća, izlučuju u vanjsku okolinu tla, gdje je njihova koncentracija manja, difuzijom, odnosno pasivnim transportom. Drugoj skupini eksudata pripadaju soli organskih kiselina koji se izlučuju u vanjsku sredinu ionskim kanalima, a trećoj skupini pripadaju spojevi velike molekularne mase, kao što su polisaharidi i proteini.

Alelokemikalije su najčešće sekundarni metaboliti ili njihovi produkti i nemaju značajnu ulogu u primarnom metabolizmu, odnosno tvari koje nemaju direktnu funkciju u primarnim biokemijskim aktivnostima poput klijanja, rasta, razvoja i reprodukcije. Fenolni spojevi čine značajnu skupinu alelokemikalija. Oni su najzastupljenija skupina sekundarnih metabolita koji se u biljkama sintetiziraju u različitim fazama rasta i razvoja. Flavonoidi su skupina raznolikih polifenolnih spojeva koji su široko rasprostranjeni u biljnim organizmima. Izolirano ih je preko 9000, a odgovorni su za šarenilo voća, povrća i cvijeća, te imaju ulogu u zaštiti biljaka od mikroba i napada insekata (Zeman i sur. 2011).

2. OSNOVNI DIO

2.1. Podjela i svojstva flavonoida

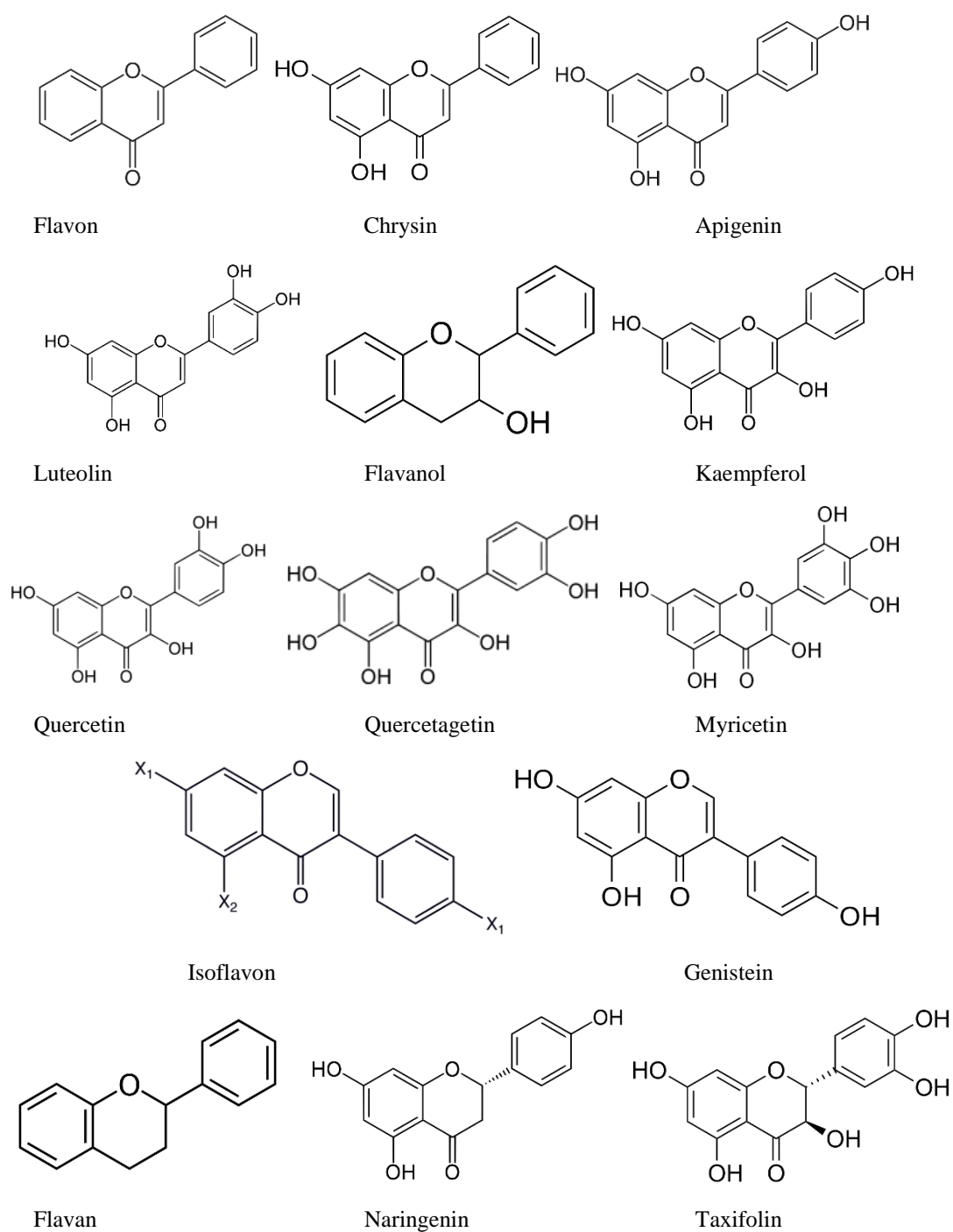
Flavonoidi su derivati 1,3-difenilpropana čija je strukturna formula C₆-C₃-C₆. Kostur flavonoida se sastoji od 15 ugljikovih atoma koji su raspoređeni u dva aromatska prstena te povezani trećim heterocikličnim piranskim prstenom (Slika 2). Veliki broj otkrivenih flavonoida upućuje i na veliku strukturnu raznolikost koja se smatra rezultatom raznih modifikacija osnovne skeletne strukture flavonoida (Amić i sur. 2007). Modifikacije uvjetuju brojne reakcije poput dimerizacije, metilacije, glikozilacije hidroksilnih grupa i flavonoidne jezgre, hidrogenacije ili hidroksilacije (Hassan i Mathesius 2012; Sugiyama i Yazaki 2014). Zahvaljujući tim brojnim reakcijama flavonoidi se mogu pojavljivati kao metilirani derivati ili aglikoni, no najčešće ih ipak susrećemo u obliku glikozida.



Slika 2. Kemijska struktura flavonoida (Preuzeto iz Kumar i Pandey 2013)

Flavonoide možemo podijeliti na flavone, flavanole, flavonole, flavanone, izoflavone i antocijanine sa većim ili manjim promjenama u kemijskoj strukturi (Slika 3). Najčešći jesu flavonoli koji su pronađeni u većini biljaka te u malo manjoj mjeri i flavoni od kojih su najpoznatiji luteolin i apigenin. Najviše zastupljenih flavona imaju peršin i celer te masline, dok su jabuke, kelj i luk najvažniji izvori flavonola (Dai i Mumper 2010).

Izoflavoni nisu steroidi iako su strukturno slični estrogenima pa se radi te sličnosti oni mogu vezati za njihove receptore. Nalazimo ih prisutne u velikoj količini u biljkama porodice Fabaceae dok su flavanoli (flavan-3-oli) građevne jedinice kondenziranih tanina. Jedni flavonoidi u biljkama isključuju druge. Primjerice, antocijanine nećemo pronaći u biljkama koje su bogate flavanonima te također dolazi do međusobnog isključivanja flavona i flavonola, dok se flavoni i flavanoni vrlo često nalaze zajedno u agrumima (Kazazić 2004).



Slika 3. Struktura odabranih flavona, flavonola, flavanona, flavanola, izoflavona, i flavana. (Preuzeto iz Grotewold 2006)

Antocijanini su biljni pigmenti pa daju crvenu, plavu i ljubičastu boju voću u kojima se nalaze uglavnom u obliku glikozida (antocijanidin povezan sa šećernom komponentom – najčešće glukozom). Tim vezanjem antocijanidin postaje stabilan i povećava se njegova topljivost u

vodi. Flavonoli su prisutni većinom u višim biljkama kao O-glikozidi. Najčešće ih nalazimo u voću porodice Rosaceae. Rutin se smatra najraširenijim i najpoznatijim flavonolskim glikozidom. Flavanoni nisu toliko često prisutni kao ostali flavonoidi. Oni dominiraju u limunu u kojemu se nalaze također u obliku glikozida, dok ih kod drugih biljaka rijetko možemo pronaći baš u takvom obliku. Najpoznatiji flavanoni jesu naringenin i hesperitin. Otkrivena su brojna pozitivna svojstva i učinci flavonoida na zdravlje čovjeka radi čega oni sve više i više postaju važnim dijelom ljudske prehrane. Djeluju antialergijski, antibakterijski, antiviralno, antikancerogeno, kao i antimikrobno i antioksidacijski (Kazazić 2004). Sva ta svojstva jesu rezultat sposobnosti i mogućnosti flavonoida da inhibiraju neke enzime, hvataju slobodne radikale ili stimuliraju neurotransmitere i hormone. Njihova navedena biološka aktivnost najviše ovisi o njihovoj građi, odnosno broju hidroksilnih skupina i konfiguraciji te mogućnosti supstitucije određenih funkcionalnih grupa unutar njihove strukture (Kumar i Pandey 2013).

2.2. Biološke aktivnosti flavonoida

Brojna su pozitivna svojstva i učinci flavonoida. Poznato je da djeluju antibakterijski tako da inhibiraju enzime i ionske kanale te time spriječavaju stvaranje i širenje bolesti koje su uzrokovane različitim bakterijskim toksinima. To je moguće zahvaljujući činjenici da bakterije u svom sastavu nemaju cAMP fosfodiesterazu i lipoksigenazu, eukariotske enzime za koje se smatra da su važna mjesta djelovanja samih flavonoida. Također, flavonoidi imaju sposobnost inaktiviranja mikrobnih adhezina i enzima povezivanjem sa proteinima bakterija kovalentnim ili vodikovim vezama (Kumar i Pandey 2013). Osim antibakterijskog, poznato je i antiviralno djelovanje flavonoida tako da utječu na replikaciju virusa ili inhibiraju njihova infekcijska svojstva.

Za flavonoide je dokazano da imaju i antikancerogeno djelovanje zahvaljujući njihovoj sposobnosti da utječu na neke regulacijske procese poput diobe stanica, popravka gena, apoptoze, transkripcije i slično (Havsteen 2002). Na te procese, a time i na nastanak i širenje tumora, utječu zahvaljujući prvenstveno svojoj antioksidativnoj aktivnosti, zatim zbog mogućnosti inhibicije aktivnosti protein kinaza te regulacije proteina p53. Njihovo najpoznatije i najbolje proučeno djelovanje je antioksidativna aktivnost kojom spriječavaju negativno djelovanje slobodnih radikala tako da ih uklanjaju ili totalno onemogućavaju njihovo nastajanje. Osim štetnog djelovanja slobodnih radikala na ljudski organizam, također problem stvaraju i reaktivni kisikovi spojevi koji mogu oštetiti DNA, pridonijeti starenju stanica, kao i mutagenezi

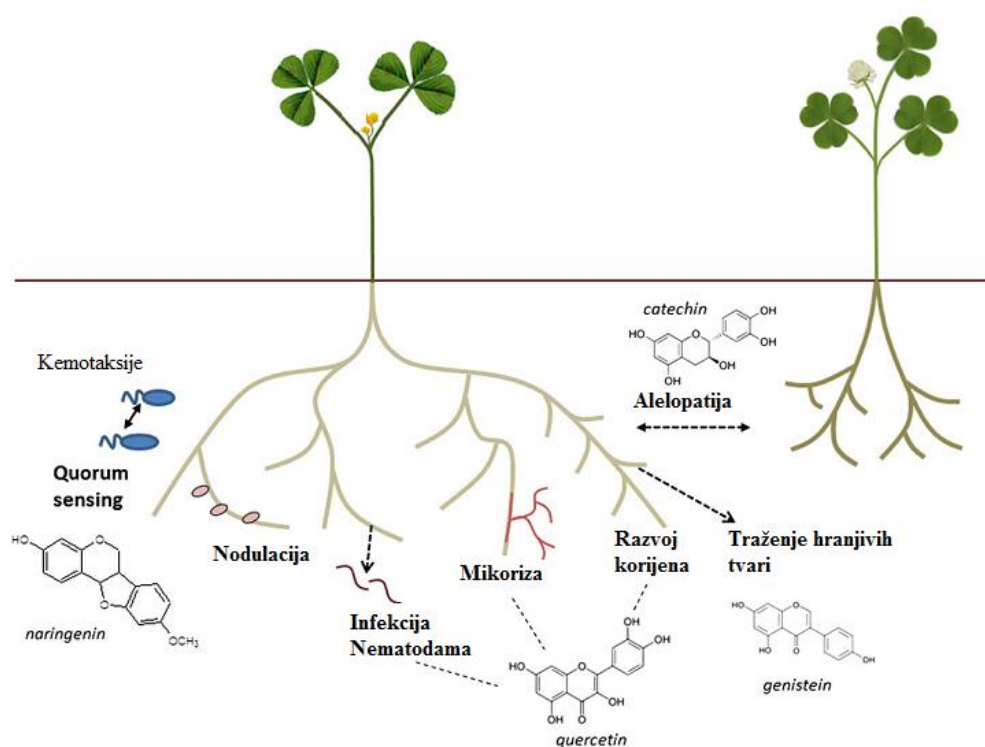
ili karcinogenezi. Flavonoidi kao antioksidansi zaštićuju organizam i protiv reaktivnih kisikovih jedinki (Kazazić 2004). U brojnim istraživanjima dokazano je da za razliku od vitamina C i E, 18 različitih flavonoida imaju veću antioksidativnu učinkovitost, tj. imaju veću sposobnost uklanjanja reaktivnih kisikovih jedinki (Berend i Grabarić 2008). Kumar i Pandey (2013) su utvrdili da flavonoidi smanjuju ekspresiju proteina p53, ako je on mutiran. Radi se o proteinu – tumor supresoru – koji regulira diobu stanice na način da spriječi nekontroliran rast i diobu, tj. možemo reći da služi za usporavanje transkripcijskih faktora da se stanični proces ne odvija prebrzo i da ne dođe do prekomjernog stvaranja grešaka koje se kasnije različitim postupcima popravka DNA neće moći ispraviti. S obzirom na to da je protein p53 glavni za odlučivanje da li prilikom oštećenja DNA dolazi do njenog popravka ili apoptoze (zavisi o procijeni štete tog proteina), ako slučajno dođe do mutacije proteina p53, dolazi do razvoja tumora. Stoga smanjivanjem ekspresije proteina p53, flavonoidi utječu na najčešću genetičku abnormalnost prilikom razvoja tumora kod ljudi, a to je upravo mutacija navedenog proteina.

Flavonoidi, također, imaju i protuupalno djelovanje. Poznato je mogu inhibirati biosintezu eikosanoida, spojeva koji otpuštaju kemijske signale, koji upućuju da dolazi do boli iz tkiva koje je zadobilo ozlijeđu. Osim toga utječu i na biosintezu citokina, mogu inhibirati lipooksigenaze ili ciklooksigenaze te tako regulirati upalne procese (Kumar i Pandey 2013).

2.3. Flavonoidi u rizosferi

Flavonoidi pripadaju sekundarnim metabolitima što znači da oni nemaju direktan utjecaj na rast i razvoj same biljke, ali djeluju primjerice kao antioksidansi koji imaju mogućnost uklanjanja slobodnih radikala. Njihovim hvatanjem i odstranjivanjem, flavonoidi sprječavaju oštećenje stanica kao i nasljednog materijala, odnosno DNA, te sprječavaju razvoj mnogobrojnih bolesti te usporavaju proces starenja. To njihovo navedeno pozitivno djelovanje osim što vežemo za čovjeka, možemo povezati i sa rizosferom, koja se smatra biološki najaktivnijim slojem tla. Time se omogućava dugotrajniji život biljaka koje kasnije, naravno, čovjek može iskoristiti i time utjecati i poboljšati svoje zdravlje prethodno navedenim pozitivnim biološkim učincima flavonoida na organizam. Osim toga, u rizosferi se odvijaju svi složeni procesi, od kemijskih preko fizičkih pa sve do bioloških procesa koji utječu na mikroorganizme i modifikaciju tla te samim time i na rast i razvoj korijena (primanje hranjivih tvari i vode), odnosno automatski imaju utjecaj na cijelu biljku.

Veliki broj otkrivenih flavonoida i njihova različita kemijska struktura, također upućuju na to da su sve više prisutni u biljkama. Većinom su sintetizirani iz p-kumaroil-CoA i malonil-CoA, iako postoje i oni flavonoidi koji su sintetizirani iz cimetne i dihidrokumarne kiseline (Mierziak i sur. 2014; Hassan i Mathesius 2012). Nakon sinteze, dolazi do njihove akumulacije najčešće na vrhu korijena, tj. u stanicama korijenove kape, dok su njihovi krajnji produkti specifično lokalizirani u određene vrste stanica i njihove organele: jezgru, vakuolu, staničnu membranu, staničnu stijenk i citoplazmu. Za njih je, osim toga, specifična i mogućnost transporta s jednog lokaliteta između različitih stanica/tkiva na drugi lokalitet, a sve to, kao i njihova sinteza, reguliraju se faktorima transkripcije (Hassan i Mathesius 2012). Neke od uloga flavonoida za koje se smatra da su glavne i odgovorne pri zaštiti, rastu i razvoju korijena, time i pri očuvanju cijele biljke jesu interakcija sa elicitorima, utjecaj na mikorizu (i nodulaciju), zaštita od patogenih organizama (posebice gljivica i Nematoda) i alelopatija (Slika 4) (Hassan i Mathesius 2012; Siczek i sur. 2014; Sugiyama i Yazaki 2014).



Slika 4. Shematski pregled uloga flavonoida u rizosferi. Flavonoidi imaju ulogu u induciranju nod gena, stimuliranju klijanja spora i granjanja hifa mikorize, kao mogući regulatori međustanične komunikacije bakterija kojom koordiniraju gensku ekspresiju populacije sukladno njezinoj gustoći (Quorum Sensing), kao repelenti za parazitske nematode, u potrazi za hranjivim tvarima i kao allelokemikalije u interakcijama između biljaka. (Preuzeto i modificirano iz Hassan i Mathesius 2012)

2.3.1. Interakcija sa elicitorima

S obzirom na to da flavonoide pronalazimo u korijenu, oni čine velik dio tvari koje se često aktivno izlučuju iz korijena, a do čega dolazi zbog „komunikacije“ sa elicitorima (Hassan i Mathesius 2012). Elicitorima smatramo tvari koje potiču povećano stvaranje sekundarnih metabolita radi doticaja sa stanicama viših biljaka, pri čemu sekundarni metaboliti sudjeluju u obrani organizma od bilo kakvog vanjskog stresa. Točnije, njih induciraju patogeni organizmi, a sami elicitori time uzrokuju aktivaciju obrambenih mehanizama. Primjerice, u korijenju biljke *Coleus blumei* (ukrasna kopriva), β -kriptogein će kao elicitor povećavati koncentraciju ružmarinske kiseline (sekundarni metabolit) zbog oponašanja napada patogena, tj. aktiviranja mehanizma obrane (Baetz i Martinoia 2014). Stres može biti biotski ili abiotski, tj. uzrokovan raznim čimbenicima, bili oni kemijski, fizikalni ili biološki. Tu dolazi do izražaja glavna biološka aktivnost ovih flavonoida kao sekundarnih metabolita, a to je antioksidativna aktivnost – obrana organizma od slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih čestica. Stoga je komunikacija sa elicitorima i cijela navedena strategija izuzetno efikasan način na proizvodnje sekundarnih metabolita radi zaštite organela i cijelog organizma.

U kojem ćemo obliku naći flavonoide, u kojoj koncentraciji, ovisi o uvjetima u kojima se biljka razvijala. Kada dođe do njihovog otpuštanja u rizosferu, tada njihova sudbina ovisi o uvjetima koje pronalazimo u tlu. Njihova topljivost u tlu varira, kao i mobilnost. Proces glikozilacije će poboljšavati njihovu topljivost u vodi, dok suprotno, proces deglikozilacije stvara više hidrofobne aglikone. Flavonoidi, kao već spomenuti antioksidansi, mijenjaju tlo i kao metalni helatori. Utječu na koncentraciju hranjivih tvari u tlu što je vrlo bitno za rast i razvoj biljaka. Posebno je bitan sadržaj fosfora i željeza u tlu. Primjerice, istraživanja su pokazala da izoflavonoidi pronađeni u lucerni (*Medicago sativa* L.) imaju sposobnost otapanja željezovog fosfata čineći time dostupnima i željezo i fosfat. Flavonoidi poput kempferola i kvercetina, imaju mogućnost redukcije željeza od Fe^{3+} do Fe^{2+} , omogućujući na taj način njegovu dostupnost za razne biljke. (Hassan i Matheusius 2012).

2.3.2. Utjecaj na mikorizu

Mikoriza je simbioza korijena biljke i micelija gljiva za koju se smatra da je odgovorna za poboljšanje zdravlja biljke. Obje, i biljka i gljiva, iz navedene simbioze imaju koristi jer gljiva omogućava biljci dostatnu količinu fosfora i ostalih minerala koji su potrebni za neometani rast i razvoj, dok gljiva od biljke prima određenu zalihu ugljikohidrata potrebnu za svoj rast. Osim opskrbe biljke hranjivim tvarima (mineralima) kojima je kopneno tlo siromašno, gljive luče također i određene hormone rasta za pomoć biljci u razvoju te zaštićuju biljke od nekih bakterija koje su prisutne u tlu. Osim toga, mikorizom su biljke zaštićene i od teških metala i soli koje bi mogle naštetiti njihovim stanicama i tkivima u razvoju (Siczek i sur. 2014; Web 1).

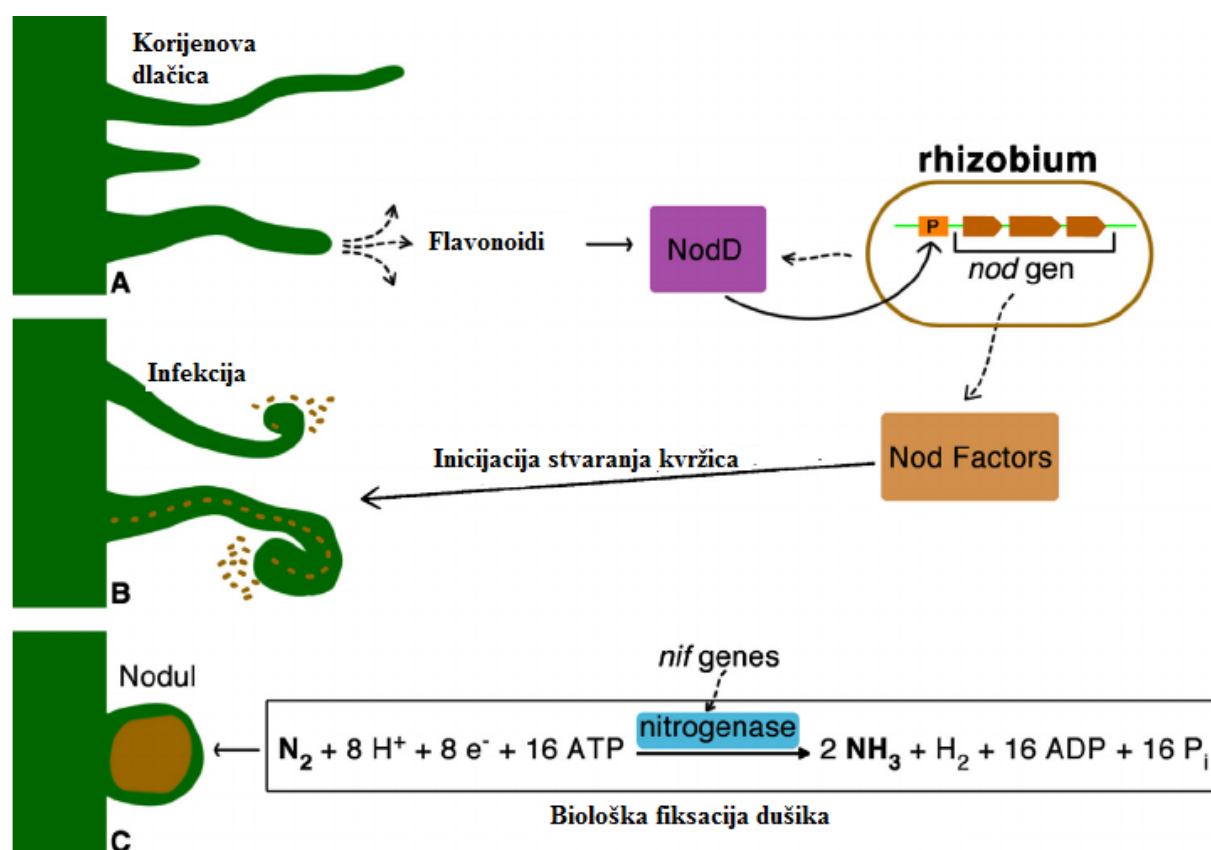
Bilo da se radi o ektomikorizi ili endomikorizi, flavonoidi mogu utjecati na mikorizu. Primjerice, ako biljkama nedostaje fosfor u tlu, flavonoidi na potiču simbiozu, tj. vezanje hifa za korijen biljke tako da bi se ona opskrblila onom koncentracijom fosfora koja joj nedostaje. Flavonoidi se akumuliraju prije vezanja hifa na korijen biljke te njihova daljnja koncentracija ovisi i varira upravo o tom vezivanju. Oni će definitivno utjecati na simbiozu, odnosno pojačavati ju, no i dalje kod nekih biljaka (koji su domaćini hifama gljiva u simbiozi) njihova prisutnost nije odlučujući faktor, tj. ne smatraju se neophodnom za samu simbiozu. Izoflavonoid kumestrol, koji je prvi put izoliran iz lucerne, izuzetno potiče rast hifa, dok neki flavonoidi koje možemo pronaći u biljci *Lupinus albus* L. sprječava vezanje hifa mikoriznih gljiva na korijen biljke, što ukazuje, također i na inhibicijsku ulogu flavonoida kod nekih biljaka.

Prema tome, istraživanja su pokazala da flavonoidi imaju izrazito bitnu ulogu prilikom povezivanja hifa gljiva i korijena biljke radi poticanja sve većeg broja flavonoidnih puteva unutar biljke posebice u onim stanicama s kojima se hife nađu u direktnom doticaju (Hassan i Mathesius 2012).

2.3.2.1. Utjecaj na nodulaciju (simbioza sa bakterijama roda *Rhizobium*):

Simbioza sa hifama gljiva može utjecati na poboljšanje simbioze sa gram negativnim bakterijama roda *Rhizobium*. Točnije, postoji mogućnost da oni flavonoidni putevi koji su inducirani mikorizom utječu na proizvodnju Nod faktora, signalnih molekula koje proizvode bakterije roda *Rhizobium*, slobodnoživuće bakterije prisutne u tlu (Hassan i Mathesius 2012; Laranjo i sur. 2013; Siczek i sur. 2014). Nod gene dijelimo u više kategorija: a) *nodA*, *nodB* i *nodC* – geni esencijalni za nodulaciju koji sudjeluju u biosintezi lipo-hitinskih oligosaharida,

b) *nodD* – gen koji regulira transkripciju nodulacijskih gena, c) *hsn* geni – geni odgovorni za nodulaciju specifičnu za domaćina (*nodFE*, *nodM* i *nodL*) te d) GSN geni – geni odgovorni za nodulaciju odabranih, specifičnih genotipova (Hungria i Stacey 1997). Sličnu podjelu navode Sugiyama i Yazaki u radu iz ne tako davne 2014. godine gdje smatraju *nodD* glavnim bakterijskim proteinom koji prepoznaje signaliziranje biljnih molekula, uz *nodA*, *nodB* i *nodC* gene. Dakle, flavonoidi imaju još jedan pozitivan utjecaj na stvaranje simbioze između mahunarki i bakterija roda *Rhizobium*, da se izvrši izmjena potrebne količine dušika biljci, dok biljka predaje bakterijama potrebne nutrijente (Slika 5). Primjerice, postoji simbioza između soje (*Glycine max* (L.) Merr.), kao biljke mahunarke, sa hifama gljiva i sa bakterijama roda *Rhizobium*, gdje je dokazana poboljšana nodulacija, tj. stvaranje većeg broja nodula koje će imati karakteristike kao i provodno tkivo da se omogući lakša izmjena nutrijenata i dušika, za razliku od same simbioze biljke mahunarke sa bakterijama (Hassan i Mathesius 2012).



Slika 5. Shematski prikaz procesa nodulacije i fiksacije biološkog dušika. (Preuzeto i modificirano prema Laranjo i sur. 2013)

S druge strane, neka istraživanja su pokazala da flavonoidi djeluju kao inhibitori stvaranja Nod gena. Primjerice daidzein i genistein kao flavonoidi induciraju stvaranje Nod gena, tj. potiču nodulaciju sa vrstom *Bradyrhizobium japonicum*, dok na potpuno suprotan način djeluju sa vrstom *Sinorhizobium meliloti*, odnosno inhibiraju ekspresiju Nod gena (Mierziak i sur., 2014). Zbog takvog pozitivnog i negativnog utjecaja ipak su potrebna daljnja istraživanja o tome koliki i kakav točno učinak na sve to imaju flavonoidi.

2.3.2.2. Utjecaj na nodulaciju (simbioza sa bakterijama roda *Frankia*):

Osim simbioze sa bakterijama roda *Rhizobium*, pronalazimo simbiozu i sa bakterijama roda *Frankia*. Te aktinomicete su najčešće u simbiozi sa nekim biljkama iz porodica Betulaceae, Coriariaceae, Casuarinaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Datisceae ili Myricaceae (Lateif i sur. 2012). Dokazano je da rod *Frankia*, kao i *Rhizobium*, poboljšava nodulaciju, primjerice kod biljke *Alnus rubra* Bong (Benoit i Berry 1997). U radu Hughesa i sur. (1999) dokazano je da kod *Alnus glutinosa* L., eksudati korijena poput dvije vrste flavonoida: kvercetina i kempferola, potiču nodulaciju, točnije vezanje sa navedenim aktinomicetama u svrhu povećavanja većeg broja nodula. Osim takve uloge flavonoida u signalizaciji, i sa ovim bakterijama, koja će doprinijeti stvaranju nodula, smatra se da imaju i samu ulogu u funkcioniranju nodula, odnosno većem otvaranju svojih flavonoidskih puteva koje doprinose boljem razvoju biljke. Laplaze i suradnici (1999) su dokazali sintetiziranje i akumuliranje flavonoida u nodulima biljke *Casuarina glauca* Sieber koja je inficirana sa *Frankia* bakterijama, a isti ti flavonoidi su pronađeni i u neinficiranom korijenju. Ipak, njihova koncentracija se značajno razlikuje, tj. flavonoidi su pronađeni u puno manjoj količini u korijenju koje nije došlo u doticaj sa *Frankia* bakterijama. Stoga je time pretpostavljeno da endofiti (u ovom slučaju bakterije roda *Frankia*) imaju itekakav utjecaj na rast i razvoj biljke s čijim korijenom one dođu u kontakt (Laplaze i sur. 1999).

Na taj način simbiozom biljke sa hifama gljiva i bakterijama, flavonoidi sebi otvaraju puteve sinteze i akumulacije u biljci te direktno doprinose zaštiti biljke, odnosno indirektno njenom neometanom rastu i razvoju, što u biljci sa manjom količinom flavonoida, tj. bez dodatne simbioze sa bakterijama nije slučaj. Drugim riječima, kod biljaka koje nisu inficirane bakterijama roda *Rhizobium* ili *Frankia*, pronaći će se flavonoidi, ali u dosta manjoj koncentraciji, a time pronalazimo i manji broj nodula koji su potrebni za opskrbljivanje biljke potrebnim nutrijentima.

2.3.3. Zaštita od patogenih organizama

Flavonoidi sudjeluju u obrani organizma (posebice korijena) od raznih patogena, od bakterija, gljivica, insekata, a to se većinom pripisuje njihovoj antioksidativnoj sposobnosti. Neka su istraživanja pokazala da dolazi do povećane sinteze nekih vrsta flavonoida (npr. fitoaleksina). Pretpostavlja se da je mehanizam zaštite i otpornosti na gljivice i njihove infekcije kod fitoaleksina povezan sa smrću stanice i ulaskom kalcijevih iona popraćenih alkalizacijom apoplasta kroz izmjenu kalijevih i vodikovih iona. Ta izmjena dovodi do depolarizacije membrane stanice te time dolazi do produljenog razdoblja oksidacijskog stanja. Izoflavonoidi, kao i svi flavonoidi, su izuzetno dobri antioksidansi, te se smatra da su oksidirani tijekom cijelog ovog procesa što može dovesti do stvaranja slobodnih toksičnih radikala koji će onda uzrokovati smrt stanica (Hassan i Mathesius 2012).

Medikarpin, izoflavonid iz graška i lucerne, primjerice ima antimikrobna svojstva te štiti biljke od patogenih gljivica kao što je *Rhizoctonia solani*. Pisatin iz graška, također zaštićuje biljku i pridonosi njenoj otpornosti na gljivicu *Nectria haematococca* (Hassan i Mathesius 2012).

Szoboszlay i suradnici (2016) su u svom radu proučavali utjecaj naringenina i 7,4'-dihidroksiflavona na bakterije koje se nalaze u blizini korijenskog eksudata kod već spomenute lucerne. Kod naringenina nije pronađen pozitivan učinak, točnije nije inhibirao rast patogena u tlu, dok je 7,4'-dihidroksiflavon pokazao pozitivan rezultat te je jedan od potencijalnih kandidata flavonoida koji može utjecati na interakcije između biljke i patogenog organizma.

Jedne od štetnijih patogena koje napadaju preko 2500 biljnih vrsta domaćina, posebice rajčicu, papriku i krastavce koji se uzgajaju u plastenicima, tj. zaštićenim prostorima jesu Nematode. No i tu flavonoidi igraju svoju zaštitnu funkciju. Nematode su oblici mikroskopskih veličina koje možemo ubrajati među štetnike prilikom proizvodnje povrća jer nastanjuju osim tekućih i stajaćih voda, i tlo te biljke. Paraziti su na svim dijelovima biljke, ali posebice na korijenu te izazivaju biotski stres, i dovode do sušenja i propadanja biljaka. Nematode roda *Pratylenchus* uzrokuju smeđu pjegavost korijena, dok rod *Meloidogyne* jesu nematode korijenovih kvržica (Web 2) (Slika 5).

Nematode usnom bodljom probijaju i oštećuju epidermu i pritom sišu staničnu tekućinu, ali takvim oštećivanjem stanica epiderme također omogućuju ulazak drugim biljnim patogenima u biljku, poput virusa, bakterija ili gljivica. Svojim napadom na korijen biljke uzrokuju pojavu kvržica, cista ili pak lezija na onim mjestima gdje se oblik krenuo hraniti. To nosi za posljedicu prvenstveno manji prinos, zatim zastoj biljaka u rastu, a ubrzo i propadanje korijena, a time i

same biljke uslijed različitih infekcija sa ostalim biljnim patogenim organizmima. Napadnuti korijen ne može asimilirati dovoljnu količinu hranjivih tvari iz tla i omogućiti daljnji rast i razvoj biljci (Web 4).



Slika 6. Korijenove kvržice uzrokovane *Meloidogynom sp.* (Web 3)

Različitim istraživanjima dokazano je da neki flavonoidi djeluju kao repelenti za neke vrste oblića, tj. da oni flavonoidi koji su izlučeni u rizosferu odbijaju te nametnike od korijena i zaštićuju biljku od infekcija (Hassan i Mathesius, 2012). Flavonoidi se uvijek nalaze u blizini korijena, čineći korijenski eksudat te time pokazuju uključenost pri zaštiti biljke od ovakvih patogena, za razliku od terpena koji vrlo lako mogu ispariti (Sugiyama i Yazaki 2014). Kod nekih biljaka poput *Medicago truncatula* Gaertn zbog nešto manje koncentracije flavonoida, dolazi do stvaranja ozlijeda napadom nametnika, no ipak u manjoj mjeri (Hassan i Mathesius 2012). Kod *Plantago lanceolata* L. pronađena je veća količina glikozida, poput aukubina i katapola, u eksudatima korijena nakon što je korijen inficiran nematodama, što bi značilo da se koncentracija obrambenih spojeva povećava nakon infekcije biljke patogenim organizmima (Dam i Bouwmeester 2016). Stoga se flavonoidima pripisuje utjecaj na ponašanje ovih nametnika, a time i zaštita različitih biljnih kultura.

2.3.4. Alelopatija

Flavonoide povezujemo i sa pojmom alelopatija, odnosno kemijskom interakcijom između jedne vrste prema drugoj: biljka-mikrob, biljka-biljojed, biljka-insekt ili mikrob-mikrob odnos. Takva interakcija se ostvaruje uz pomoć alelokemikalija, kemijskih spojeva koji se razlikuju po kemijskom sastavu, vrsti organizma na kojeg će djelovati te načinu djelovanja, no najčešće ih nalazimo u obliku glikozida koji su topljivi u vodi. Svrha tih alelokemikalija je smanjivanje stresa uslijed napada brojnih nametnika (primjerice već ranije spomenute Nematode ili pak korovi), a one služe kao signalne molekule za upozoravanje prisutnosti nekog drugog kompetitora (Slika 4). Druga biljka, kojoj su te signalne molekule upućene, upija alelokemikalije najčešće putem korijena kada dospiju u rizosferu ili ih apsorbiraju iz atmosfere (Zeman i sur. 2011).

Izuzetno dobar primjer alelopatije je lucerna (*Medicago sativa* L.) koja zbog velike koncentracije saponina djeluje na biljne štetočine kao što su oblići. Preporučuje se sadnja lucerne u blizini drugih biljaka, primjerice mrkve ili rajčice, za zaštitu tih biljaka od oblića, ali osim navedenog zaštitnog karaktera, ona i njeni spojevi takvim interakcijama utječu i na povećani prinos plodova. Naime, saponin kod lucerne, kao i limonidi kod *Azadirachta indica* (nim) nematocidno, a neka su istraživanja pokazala da pozitivno djelovanje lucerne možemo zahvaliti glikozidima medikagenske kiseline (Zeman i sur. 2011).

Mnoga istraživanja su pokazala alelopatski učinak biljaka bilo da se njihove alelokemikalije oslobađaju iz lišća u obliku plinova, ispiranjem lišća ili stabljike, razgradnjom biljnih ostataka ili izlučivanjem direktno iz korijena u rizosferu. Korijenski eksudati osim svojih pozitivnih učinaka, mogu imati i negativno djelovanje na druge biljke poput njihove inhibicije rasta i klijanja (Dam i Bouwmeester 2016). Zabilježen je negativni učinak iglica *Pinus radiata* D. Don na klijanje i rast *Trifolium repens* L., *Lactuca sativa* L. i *Dactylis glomerata* L., kao što alfa-pinen, kojeg izlučuje *Quercus ilex* L., inhibira klijanje sjemena drugih biljaka koje su u blizini. *Prunus cerasus* L. u blizini *Prunus avium* L. slabo raste, kao i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. u blizini *Lonicera mackii* (Rupr.) Maxim. (Zeman i sur. 2011). Ovakvo alelopatsko djelovanje biljaka može doprinijeti boljem razvoju tj. invazivnosti nekih egzotičnih vrsta poput *Heracleum mantegazzianum* odnosno gigantskom svinjskom korovu koji je imao utjecaj na zelenu salatu tako da je smanjio njenu klijavost (Dam i Bouwmeester 2016). Taj negativni utjecaj na rast od strane alelokemikalija možemo povezati sa djelovanjem na hormone biljaka, poput auksina. Točnije flavonoidi aglikona djeluju na polarni transport auksina u biljci tako da ga inhibiraju što će dovesti do poremećaja u njihovoj koncentraciji koji su inače odgovorni za diobu i

diferencijaciju stanica, kao i stimulaciju cvjetanja te sazrijevanje i otpadanje plodova (Zeman i sur. 2011).

3. ZAKLJUČAK

Lista flavonoida, kao i njihovi pozitivni učinci, sve više i više raste te upravo zbog tih korisnih primjena, ove kemijske spojeve treba prestati zanemarivati. Njihove brojne uloge u rizosferi, počevši od sudjelovanja u mikorizi, zaštite od raznih štetočina i infekcija mikroorganizama, alelopatije i djelovanja kao signalnih molekula u procesu nodulacije, pa sve do sudjelovanja u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, doprinose boljem razvoju korijena u toj zoni koji i je osnova za što bolji rast i razvoj biljke. Iako se već dosta zna o ovim sekundarnim metabolitima, današnji značajan razvoj tehnologije, kao i dosadašnji napreci u biologiji, mogu itekako doprinijeti boljem i detaljnijem razumijevanju njihove uloge u interakcijama sa drugim biljkama i patogenim organizmima. Primjerice signaliziranje *Nod* gena je već vrlo dobro proučeno, dok bi vjerojatno bolje razumijevanje procesa izlučivanja korijenskog eksudata moglo doprinijeti detaljnijem otkrivanju važnosti sastojaka eksudata, kao i poboljšanju zdravlja biljke. Proširivanje znanja o djelovanju te signalizaciji flavonoida moglo bi omogućiti njihovu praktičniju upotrebu u ekologiji, poljoprivredi i medicini.

4. LITERATURA

- Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D., Rastija V., Lučić B., Trinajstić N. (2007) SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids, *Current Medicinal Chemistry* 827-845.
- Baetz U, Martinoia E. (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* 19(2):90-98.
- Benoit L., Berry A. (1997) Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (Actinomycetales), *Physiologia Plantarum* 99(4): 588-593.
- Berend S., Grabarić Z. (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 59:205-212.
- Dai J., Mumper R.J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules* 15(10): 7313-7352.
- Dam N.M., Bouwmeester H.J. (2016) Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication, *Trends in Plant Science* 21: 256-265.
- Grotewold E. (2006). *The Science of Flavonoids*, Springer New York
- Hassan S., Mathesius U. (2012) The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions, *Journal of Experimental Botany* 63(9): 1-16.
- Havesteen B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology and Therapeutics* 96: 67 – 202.
- Hughes M., Donnelly C., Crozier A., Wheeler C.T. (1999) Effects of the exposure of roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation. *Canadian Journal of Botany* 77(9): 1311-1315.
- Hungria M., Stacey G. (1997) Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biology and Biochemistry* 29(5-6): 819-830.
- Kazazić SP. (2004): Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55:279-290.

Kumar S., Pandey A.K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal 1-16.

Laplaze L., Gherbi H., Frutz T., Pawlowski K., Franche C., Macheix J.J. i sur. (1999) Flavan-containing cells delimit *Frankia*-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. Plant Physiology 121(1): 113–122.

Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S. 2013. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus, Elsevier. Microbiological Research 169(1): 2-17.

Lateif K.A., Bogusz D., Hoher V. (2012) The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria, Plant Signaling and Behavior 7(6): 636-641.

Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. (2014) Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. Molecules 19(10): 16240-16265.

Siczek A., Frac M., Nawrocka A., Wielbo J., Kidaj D. (2014) The response of rhizosphere microbial properties to flavonoids and Nod factors. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science, 65:2, 125-131

Sugiyama A., Yazaki K. (2014) Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication, Plant Biotechnology 31: 431-443.

Szoboszlay M., White-Monsant A., Moe L.A. (2016) The Effect of Root Exudate 7,4'-Dihydroxyflavone and Naringenin on Soil Bacterial Community Structure, PloS ONE 11(1): 1-16.

Zeman S., Fruk G., Jemrić T. (2011) Alelopatski odnosi biljaka: pregled djelujućih čimbenika i mogućnost primjene, Glasnik zaštite bilja, 52-59.

Walker T.S., Pal Bais H., Grotewold E., Vivanco J.M. (2003) Root Exudation and Rhizosphere Biology, Plant Physiology 132(1): 44-51.

WEB IZVORI

Web 1. <http://www.bio-buducnost.com/mikoriza.html> (15.08.2017.)

Web 2. <https://www.agroklub.com/povrcarstvo/kako-suzbiti-stetne-nematode/23536/>
(16.08.2017.)

Web 3. <http://www.agrozastita.rs/index.php/m-povrtarstvo?start=18> (16.08.2017.)

Web 4. Nematode kao štetnici povrtlarskih kultura u zaštićenim prostorima (2016) – mr.sc.
Ivan Poje, dipl.ing.agr.; PPT (17.08.2017.)